

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA

***APLICAÇÕES DA METODOLOGIA FISH EM CITOGENÉTICA DE
NEOPLASIAS.***

Acadêmica: Carolina Ester Foppa

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro

FLORIANÓPOLIS - SC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA

***APLICAÇÕES DA METODOLOGIA FISH EM CITOGENÉTICA DE
NEOPLASIAS.***

Carolina Ester Foppa

Trabalho apresentado como
requisito para o cumprimento da
disciplina Estágio II (BIO 5156)
do currículo do Curso de
Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro

Florianópolis - SC
Novembro/ 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pelo apoio incondicional, por acreditarem no meu sonho e me ajudarem a torná-lo realidade.

Aos meus pais, em especial, por me darem força e incentivarem a ser persistente naquilo que eu acredito.

À minha irmã Luciana por dividir comigo a vida, as alegrias e tristezas e estar sempre do meu lado.

À Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro, pela orientação, ensinamentos e confiança a mim dispensada.

Aos membros da banca examinadora, Eliana Ternes Pereira, Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar e Ana Paula Carneiro Brandalize, pelo tempo e dedicação ao analisar e avaliar este trabalho.

Aos meus antigos companheiros de laboratório, pelo carinho, compreensão e pelos bons momentos que passamos juntos ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos de graduação pelo apoio, pelos sorrisos e por tantos momentos compartilhados durante esses quatro anos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho:

Muito Obrigada!

RESUMO

APLICAÇÕES DA METODOLOGIA FISH EM CITOGENÉTICA DE NEOPLASIAS

As neoplasias surgem em consequência de mutações acumulativas no material genético (DNA) de células normais, as quais sofrem alterações progressivas até se tornarem malignas. A aneuploidia – alteração no número de cromossomos da célula - é uma característica comum em tumores humanos, sendo, frequentemente, resultado de uma instabilidade cromossômica. As células tumorais apresentam diversas anormalidades cromossômicas, envolvendo alterações numéricas e/ou estruturais, as quais evidenciam a participação de processos citogenéticos na patogênese tumoral. A metodologia FISH possibilita a análise de um grande número de células em metáfase e em intérfase, contornando uma dificuldade importante que é a obtenção de metáfases de células neoplásicas. Também permite a identificação de alterações estruturais mais discretas, abaixo da resolução da citogenética convencional. O objetivo do estudo inclui a identificação, através da metodologia FISH, do número de cópias dos cromossomos 8, 11 e 17 em amostras de tumores mamários, e dos cromossomo 7, 8 e 11 em amostras de leucemia, utilizando sondas centroméricas, bem como a detecção das translocações 15;17 e 9;22 em amostras de leucemia utilizando sondas locus-específicas. No presente estudo, amostras tumorais foram obtidas de pacientes com câncer de mama e leucemia atendidos no Hospital Universitário/UFSC. Nas amostras de tumores mamários houve heterogeneidade nas células tumorais sendo evidente a presença de aneuploidia para os cromossomos avaliados. Os resultados da avaliação das amostras de leucemia confirmam a importância do estudo citogenético tanto no pré-tratamento, possibilitando a estratificação e orientação terapêutica adequada, como no pós-tratamento para auxiliar na detecção da doença residual mínima. A avaliação dos cromossomos realizada neste e em outros estudos auxiliam na compreensão do câncer o que possibilita avanços no diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: Câncer de mama, FISH, aneuploidia, Leucemia.

SUMÁRIO

TABELAS

FIGURAS

ABREVIACÕES

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1.2 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E CÂNCER	1
1.3 FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION): PRINCÍPIOS E MÉTODOS	5
1.3.1 Tipos de Sondas	6
1.3.2 Aplicações	8
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. GERAIS	12
3.2 ESPECÍFICOS.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 ABORDAGEM ÉTICA E EXPERIMENTAL	13
4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES	13
4.3 COLETA DE MATERIAL	13
4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	14
4.5 FIXAÇÃO.....	14
4.6 PREPARO DAS LÂMINAS	14
4.7 FISH.....	14
4.7.1 Pré- tratamento das lâminas.....	14
4.7.2 Preparo da sonda.....	15
4.7.3 Denaturação e hibridização.....	15
4.7.4 Lavagem pós-hibridização e detecção	15
4.7.5 Análise da FISH.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS.....	17
5.2 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DOS TUMORES MAMÁRIOS.....	18
5.3 AVALIAÇÃO FISH DOS TUMORES MAMÁRIOS	20
5.4 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FISH DAS AMOSTRAS DE LEUCEMIA.....	26
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS	32
8. ANEXOS.....	37
8.1 ANEXO 1.....	37
8.2 ANEXO 2.....	38
8.3 ANEXO 3.....	40
8.4 ANEXO 4.....	41
8.5 ANEXO 5.....	42

TABELAS

Tabela 1

Idade e história de câncer em parentes de primeiro grau nas pacientes avaliadas.....17

Tabela 2

Diagnóstico Anátomo-Patológico e Imuno-histoquímica (IHQ) de neoplasias mamárias.....18

Tabela 3

Quantidade de sinais amplificados nos núcleos interfásicos analisados.....21

Tabela 4

Número de registro no Laboratório de Citogenética, idade, sexo e indicação clínica dos pacientes.....27

Tabela 5

Resultados do cariótipo com bandas e cariótipo com FISH das amostras de leucemia, segundo o ISCN (2005)28

FIGURAS

Figura 1

Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 93.....23

Figura 2

Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 76.....23

Figura 3

Amplificação da região centromérica do cromossomo 8 nas amostras avaliadas.....24

Figura 4

Amplificação da região centromérica do cromossomo 11 nas amostras 70, 83 e 93.....24

Figura 5

Amplificação da região centromérica do cromossomo 17 nas amostras avaliadas.....25

Figura 6

Presença da translocação 15;17 na amostra 3507.....29

ABREVIATÓES

ABL- "ABelson Leukemia"

BCR- "breakpoint cluster region"

BEG - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

BRCA1 - "breast cancer susceptibility gene 1"

BRCA2 - "breast cancer susceptibility gene 2"

CCB - Centro de Ciências Biológicas

CIN – Chromosomal instability

c-MYC - "myc proto-oncogene protein"

del - deleção

ER - Receptor de Estrogênio

FISH – "*Fluorescence in situ hybridization*" (hibridação "*in situ*" fluorescente)

HER-2 ou c-erbB-2 - receptor de fator de crescimento epidermal

HU - Hospital Universitário

IHQ - Imunohistoquímica

INCA - Instituto Nacional de Câncer

inv – inversão

LA – Leucemia Aguda

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda

MLL – Mixed-lineage Leukemia

OMS - Organização Mundial da Saúde

Ph – Cromossomo Philadelphia

PML – "promyelocytic leukemia"

PR - Receptor de Progesterona

RARA – "retinoic acid receptor alfa"

SMD – Síndrome Mielodisplásica

t - Translocação

TP53 - "Tumor Protein p53"

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

WHO - World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

As neoplasias apresentam-se como uma das principais causas de mortalidade na população mundial. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as projeções para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, estimam a ocorrência 466.730 casos novos de câncer no Brasil. Entre as mulheres destaca-se o câncer de mama sendo que a estimativa para 2008 no Brasil foi de 49.400 novos casos. Para as leucemias a estimativa para o mesmo ano foi de 9540 novos casos (INCA, 2008).

As neoplasias são consideradas doenças genômicas, surgindo como consequência de mutações acumulativas no material genético (DNA) de células normais, as quais sofrem alterações progressivas até se tornarem malignas. A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas e pode envolver de dezenas a centenas de genes, que são alterados através de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidade genômica e processos epigenéticos. Os principais grupos de genes alterados no processo neoplásico são os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (DANTAS *et al.*, 2009).

A identificação dos genes associados ao câncer proporciona uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, possibilitando também alternativas mais sensíveis para a detecção, estratificação e orientação terapêutica, conduzindo assim ao maior sucesso no tratamento (GARNIS *et al.*, 2004).

1.2 Alterações Cromossômicas e Câncer

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de metastatizar para tecidos distantes. Esta perda de controle da proliferação celular é consequência de danos nos mecanismos de regulação do ciclo celular, que possibilitam que a célula alterada tenha maior probabilidade de adquirir novas alterações (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Toda vez que uma célula se divide, ela deve duplicar seu genoma e distribuí-lo equitativamente entre as células-filhas. As falhas neste processo resultam em células-filhas com número anormal de cromossomos, uma condição denominada aneuploidia.

Estudando embriões de ouriço do mar submetidos a divisões mitóticas anormais, Theodor Boveri (1914) descreveu o efeito da aneuploidia nas células e na fisiologia dos organismos. Baseando-se em seus estudos e nas observações de von Hansemann, Boveri propôs que uma constituição anormal de cromossomos nas células poderia promover o câncer (HOLLAND & CLEVELAND, 2009).

Hoje, é demonstrado que a aneuploidia é uma característica genética comum nos tumores sólidos humanos. No entanto, ainda não há um consenso se a aneuploidia seria a causa ou consequência da transformação neoplásica das células (HOLLAND & CLEVELAND, 2009).

A aneuploidia pode ser decorrente da instabilidade cromossômica (do inglês *Chromosomal Instability*- CIN), uma forma de instabilidade genética na qual o ganho e a perda de cromossomos inteiros é elevada, resultando em um cariótipo instável (WEAVER & CLEVELAND, 2006). Apesar de ocorrer frequentemente nos tumores e apresentar um grande potencial para a evolução do câncer, a definição de CIN é, muitas vezes, usada de forma imprecisa (GEIGL *et al.*, 2008). É importante ressaltar que aneuploidia e CIN não são sinônimos: enquanto a aneuploidia se refere ao “estado” de ter um número anormal de cromossomos, CIN se refere à imprecisão da divisão celular, que gera uma taxa elevada de células com ganho ou perda de cromossomos (HOLLAND & CLEVELAND, 2009).

Embora muitas células aneuplóides apresentem CIN, cariótipos aneuplóides podem se manter estáveis, como observado na Síndrome de Down em humanos, onde ocorre trissomia do cromossomo 21 (GEIGL *et al.*, 2008).

É possível uma célula tornar-se aneuplóide devido a erros durante a divisão cromossômica na mitose. Esses erros podem ser causados por: (a) defeitos na coesão dos cromossomos, (b) presença de um fuso mitótico multipolar, em resposta a uma amplificação do centrôssomo, (c) erros na ligação dos cromossomos ao fuso ou (d) defeitos na sinalização do *checkpoint* mitótico, permitindo que as células entrem em anáfase mesmo na presença de cromossomos não-alinhados ou não ligados ao fuso (KOPS *et al.*, 2005).

Alguns experimentos em camundongos têm demonstrado que a aneuploidia pode aumentar o risco de transformação neoplásica, porém, ainda não está claro como a aneuploidia aumenta esse risco. Uma possibilidade seria a criação de um desequilíbrio

protéico gerado pela aneuploidia, o qual facilitaria o desenvolvimento de tumores pela promoção de uma instabilidade genômica adicional. Em alguns casos, o aumento dessa instabilidade permitiria a aquisição de mutações que promovem o câncer (HOLLAND & CLEVELAND, 2009). Uma segunda possibilidade seria o fato de que a perda ou ganho de cromossomos poderia aumentar a chance da célula perder a heterozigose de um gene supressor de tumor ou amplificar um oncogene através da duplicação de um cromossomo, aumentando a possibilidade de desenvolvimento neoplásico (KOPS *et al.*, 2005).

Parte da dificuldade em estudar o papel da aneuploidia no câncer é decorrente da diversidade e complexidade das anomalias cromossômicas verificadas nos diversos tipos de tumores. As células tumorais apresentam alterações numéricas envolvendo cromossomos inteiros, sendo também freqüentes alterações estruturais, incluindo deleções, amplificações e translocações (HOLLAND & CLEVELAND, 2009).

Com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico houve um rápido progresso da citogenética tumoral caracterizando-se alterações cromossômicas específicas em leucemias e linfomas (SILVA, 2004).

A caracterização das anormalidades cromossômicas específicas em tumores humanos possibilitou a identificação dos genes localizados nas regiões envolvidas. Verificou-se assim o envolvimento de genes associados ao controle da proliferação e diferenciação celular, tais como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor que quando desregulados desempenham uma função crítica no desenvolvimento da neoplasia. (LOURO *et al.*, 2002).

Algumas destas alterações recorrentes têm sido utilizadas como marcadores de diagnóstico e prognóstico, orientando o desenvolvimento de terapias que visam alvos celulares específicos (ROGATTO & RAINHO, 2004).

A citogenética aplicada à oncologia iniciou-se em 1960 com a detecção do cromossomo *Philadelphia* (Ph) na leucemia mielóide crônica (LMC) (NOWELL & HUNGERFORD, 1960).

Esta observação foi rapidamente confirmada por outros pesquisadores, sendo também caracterizadas alterações cromossômicas específicas em outras neoplasias hematológicas e em tumores sólidos (SILVA, 2004).

Um dos exemplos mais emblemáticos é a translocação entre os cromossomos 9 e 22 - t(9;22), que resulta na formação do cromossomo *Philadelphia*, observado em cerca de 90-95% dos casos de LMC (FETT-CONTE *et al.*, 2000). Como consequência desta translocação, o oncogene *c-ABL*, mapeado em 9q34, se funde com uma pequena região do cromossomo 22,

designada como região de ponto de quebra ou gene *BCR* (FETT-CONTE *et al.*, 2000). Essa translocação resulta em uma proteína quimérica *BCR-ABL* que ativa, em cascata, vias de sinalização que controlam o crescimento, a diferenciação e, possivelmente, a adesão de células hematopoéticas. A desregulação destas vias de sinalização resulta na proliferação anômala das células-tronco hematopoéticas (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Outro rearranjo que também contribuiu para a elucidação do processo leucemogênico foi a translocação entre os cromossomos 15 e 17 - t(15;17) - observada na leucemia promielocítica aguda (LPA). A LPA corresponde a 10%-15% das leucemias mielóides agudas (LMA), e apresenta em cerca de 90% dos casos a translocação t(15;17)(q22;q21). Este rearranjo promove a fusão dos genes *PML*, um fator transcricional da linhagem mielóide, localizado no cromossomo 15, com o gene que codifica o receptor α nuclear do ácido retinóico (*RARA*), localizado no cromossomo 17. O resultado deste rearranjo cromossômico é a desregulação do receptor α do ácido retinóico que é crucial na diferenciação da linhagem mielóide. Como consequência, há a interrupção da maturação celular seguida de proliferação descontrolada (SAGRILLO *et al.*, 2005).

Estes rearranjos cromossômicos específicos, resultam de quebras de cadeia dupla do DNA, seguida pela troca recíproca de fragmentos entre dois ou mais cromossomos. Estes rearranjos podem acarretar a expressão aberrante de oncogenes ou a geração de proteínas quiméricas (REGO & PANDOLFI, 2002).

As amplificações gênicas consistem na replicação redundante de uma mesma sequência de DNA, podendo conter centenas de cópias de um mesmo gene ou genes que codificam diversas proteínas. A amplificação acarreta um aumento no nível de transcrição dos genes amplificados, que pode conferir à célula uma vantagem proliferativa (SILVA, 2004). Um exemplo é a amplificação do proto-oncogene *HER-2* que ocorre em alguns tipos de câncer de mama e altera as vias de sinalização que podem levar à inibição da apoptose e facilitar a proliferação celular (PUPA *et al.*, 2005).

A ativação de oncogenes leva ao descontrole das funções proliferativas da célula, podendo ocasionar o surgimento de um tumor. Alguns oncogenes possuem a capacidade de inibir a apoptose, como é o caso do oncogene *c-MYC*, localizado na região 8q24, no braço longo do cromossomo 8. Outro efeito do oncogene *MYC* é a sua habilidade de induzir danos no DNA, promovendo rearranjos cromossômicos grosseiros, alterando de forma inapropriada a progressão do ciclo celular e prejudicando o reparo do DNA (LOURO *et al.*, 2002).

Os genes supressores de tumor, dentre eles *BRCA1* (17q21), *BRCA2* (13q12.3) e *TP53* (17q13.1), estão associados ao processo carcinogênico através de sua inativação, e para a maioria dos genes supressores, as mutações são recessivas, ou seja, somente comprometem a função destes genes quando os dois alelos estão inativados (SILVA, 2004). Aproximadamente 50% dos cânceres humanos apresentam mutações no *TP53* (PINTO & FELZENSZVALB, 2003) enquanto os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão associados à susceptibilidade ao câncer de mama.

Com o aperfeiçoamento da metodologia citogenética para avaliação de células neoplásicas é possível ampliar a compreensão do processo neoplásico.

1.3 FISH (fluorescence in situ hybridization): princípios e métodos

A avaliação das células neoplásicas através da metodologia de FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) possibilita uma maior riqueza de detalhes em relação às técnicas citogenéticas tradicionais.

Esta técnica consiste num aperfeiçoamento da hibridização *in situ* (HIS), desenvolvida em 1969 por Gall e Pardue, tornando-se um dos métodos mais promissores para a citogenética nos últimos anos. Trata-se de uma metodologia sensível e específica, sendo aplicada em diversas áreas, como na biologia do desenvolvimento, na citotaxonomia, melhoramento genético e citogenética clínica (GUERRA, 2004).

O princípio da técnica se fundamenta nas características moleculares do DNA que é formado por duas fitas complementares unidas pelo pareamento de bases específico. Estas fitas complementares podem ser facilmente separadas, por meio de aquecimento ou tratamento alcalino. As fitas simples, ou denaturadas, podem ser renaturadas, por resfriamento ou acidificação do meio, voltando à conformação de fita dupla (pela especificidade do pareamento). Se no momento da renaturação do DNA houver na solução disponibilidade de moléculas complementares marcadas (sondas), estas competirão com as fitas de DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas ao DNA alvo, ao invés da fita complementar original, e detectadas seletivamente (GUERRA, 2004).

Inicialmente, foram utilizadas sondas marcadas com isótopos radioativos, seguida da detecção das sondas por autorradiografia. Posteriormente passou-se a utilizar sondas marcadas com fluorocromos (FISH) e visualização em microscópio de fluorescência. Esta metodologia possui alta sensibilidade permitindo a avaliação de regiões discretas do genoma.

O uso dos fluorocromos além de proporcionar maior segurança, possibilita uma reação mais rápida e a avaliação simultânea de diversas sondas pela utilização de diferentes fluorocromos simultaneamente (SPONCHIADO *et al.*, 2005).

Desta forma a FISH complementa as demais técnicas de bandeamento, possibilitando a identificação de anormalidades além da resolução visual, como microdeleções, e rearranjos cromossômicos que envolvem regiões de difícil avaliação pelas técnicas de bandeamento (rearranjos críticos) ou de difícil interpretação (rearranjos dentro do mesmo cromossomo) (VARELLA-GARCIA *et al.*, 2004).

Outra característica importante da FISH é a possibilidade de obtenção de informações genômicas em núcleos interfásicos, contornando uma limitação importante das metodologias citogenéticas convencionais que é a obtenção de metáfases de células tumorais.

1.3.1 Tipos de Sondas

As sondas para hibridização podem ser obtidas a partir de fragmentos de DNA ou RNA isolados, purificados e amplificados. Podem ser complementares a seqüências únicas ou repetitivas (SUMNER, 2003).

Várias classes de sondas de DNA são atualmente utilizadas para FISH, cada uma adaptada a um tipo específico de abordagem. Os três tipos de sondas mais utilizadas são as centroméricas (ou de seqüências repetitivas - CEP), as sondas locus-específicas (ou de seqüências únicas - LSI) e sondas de cromossomos inteiros (pintura cromossômica - WCP). As sondas de seqüências repetitivas consistem de DNA satélite complementares a estruturas específicas do cromossomo como centrômeros e regiões heterocromáticas ou teloméricas. Essas seqüências repetitivas variam em composição nos diferentes cromossomos, de modo que foram desenvolvidas sondas cromossomo-específicas para todos os cromossomos humanos. As sondas repetitivas produzem sinais de hibridização muito brilhantes e têm sido aplicadas para detectar ganhos e perdas de cromossomos inteiros (aneuploidias) (HACKEL & VARELLA-GARCIA, 1997).

As sondas locus-específicas ou de seqüências únicas, são obtidas pela amplificação em sistemas microbiológicos (YACs, cosmídeos ou outros vetores) ou pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e têm sido utilizadas na identificação de genes específicos. Os sinais gerados por sondas de seqüência única são geralmente menos intensos do que os sinais

gerados pelas sondas repetitivas. As sondas LSI possibilitam a detecção de ganho ou perda parcial de regiões cromossômicas discretas (HACKEL & VARELLA-GARCIA, 1997).

Uma vez que a detecção dos rearranjos cromossômicos específicos nas leucemias é de grande importância clínica, foram desenvolvidas metodologias adequadas para a detecção dos mesmos. Assim, foram padronizadas sondas locus-específicas para a detecção dos rearranjos cromossômicos recorrentes em leucemias, utilizando-se fluorocromos diferentes para cada uma das regiões envolvidas (FISCHER, *et al.*, 1996).

Outra classe de sonda consiste em um pool de múltiplas seqüências descontínuadas de DNA (HACKEL & VARELLA-GARCIA, 1997). Esses pools são utilizados para "pintar" um cromossomo inteiro ou uma região cromossômica e são úteis na caracterização de rearranjos cromossômicos complexos.

Na cariotipagem espectral (*Spectral karyotyping* - SKY) são usadas 24 sondas cromossomo-específicas. Cada sonda é diferencialmente marcada com um, dois, três ou quatro corantes fluorescentes resultando em uma assinatura espectral única para cada cromossomo. A análise espectral não é dependente da intensidade do sinal, mas apenas da imagem espectral criada pela marcação combinatória da sonda. A cariotipagem espectral permite a detecção de rearranjos cromossômicos estruturais, constitucionais ou adquiridos, aumentando a sensibilidade da citogenética tumoral (MACVILLE *et al.*, 1997).

Enquanto as sondas centroméricas são úteis para a detecção de alterações numéricas, as sondas de cromossomo inteiro ou pintura cromossômica são eficientes para a detecção de alterações estruturais, colorindo todo o cromossomo ou segmentos de cromossomos em cores diferentes (LICHTVAN, 2007).

O uso de sondas de pintura cromossômica, na análise de células em interfase, é de alguma maneira limitado para detecção de rearranjos cromossômicos, mas tem fornecido informações importantes sobre a localização dos cromossomos no núcleo interfásico, possibilitando a avaliação de seu posicionamento no núcleo e a detecção de territórios cromossômicos. Esta organização tem se mostrado dinâmica, variando com o estado funcional da célula. Estas informações estão relacionadas com a funcionalidade da região (RAJAPAKSEA, *et al.*, 2009).

1.3.2 Aplicações

A metodologia FISH possibilita a análise de células em metáfase e em intérfase, contornando uma dificuldade importante que é a obtenção de metáfases de células neoplásicas. Outra grande vantagem desta metodologia é a possibilidade de se analisar um grande número de células rapidamente. Também permite a identificação de alterações estruturais mais discretas, abaixo da resolução da citogenética convencional (ROGATTO, 2000).

Com isso as aplicações desta metodologia vêm continuamente se ampliando, sendo utilizada na identificação de cromossomopatias, diagnóstico pré-natal, reconhecimento de doenças virais, monitoramento pós-transplante, diagnóstico de leucemias e na pesquisa básica (detecção de alterações cromossômicas em células tumorais e estudos de expressão gênica) (ROGATTO, 2000).

A utilização de sondas locus-específicas permite avaliar alterações onde a região envolvida está abaixo da resolução da citogenética clássica, sendo usada na análise de diversas síndromes denominadas conjuntamente por síndromes de microdeleções, como por exemplo, nas síndromes de Prader-Willi e de Angelman onde ocorre deleção de uma pequena região do cromossomo 15 (FRIDMAN *et al.*, 2000).

Uma importante aplicação da citogenética em intérfase é o diagnóstico pré-natal, e o diagnóstico pré-implantação. A detecção de alterações numéricas é realizada pela utilização simultânea de sondas centroméricas dos cromossomos 13, 18, 21, X e Y. As alterações destes cromossomos compreendem 2/3 das alterações detectadas na amniocentese e 85-90% das alterações presentes em recém-nascidos (ACMG/ASHG, 2000).

A técnica FISH vem sendo aplicada com sucesso para detecção de rearranjos cromossômicos específicos nas leucemias, sendo importante também para o monitoramento da eficácia da terapia e detecção de doença residual mínima após a remissão clínica (VANCE *et al.*, 2006).

Para a detecção do cromossomo Philadelphia na LMC, utiliza-se a FISH com sondas locus-específicas e cores diferentes para marcação das regiões envolvidas, buscando-se sinais híbridos para caracterização do rearranjo tanto em metáfases como em núcleos interfásicos. A utilização de sondas de dupla cor e dupla fusão ampliou a resolução desta metodologia, sendo possível a detecção do rearranjo também pelo número de sinais (VARELLA-GARCIA,

2003). Metodologia similar tem sido utilizada para detecção da translocação 15;17 presente na LPA, que acarreta a justaposição dos genes *PML* e *RARA* (SAGRILLO *et al.*, 2005).

Estudos mais recentes consideram a técnica de FISH a mais precisa e confiável para a pesquisa da amplificação do gene *HER2* no câncer de mama, obtendo-se melhor correlação com o prognóstico e resposta à terapêutica. No carcinoma invasivo da mama, a superexpressão e/ou amplificação do gene *HER2* está presente em 15% a 30% dos casos. A demonstração da superexpressão ou da amplificação é essencial para a utilização da terapia com o anticorpo monoclonal anti-*HER2* (trastuzumab), que tem benefícios clínicos significativos. Recomenda-se a avaliação do *status* de *HER2* em todos os carcinomas de mama no momento do diagnóstico ou na recidiva/metastização (ANDRÉ *et al.*, 2005).

A FISH pode ser aplicada a uma grande variedade de amostras biológicas, incluindo suspensões de células, tecidos sólidos desagregados, fluidos corporais externos, bem como cortes histológicos de tecidos sólidos (HACKEL & VARELLA-GARCIA, 1997).

A maior dificuldade para a popularização desta metodologia é a obtenção das sondas e a validação das mesmas para uso clínico. As sondas comerciais apresentam boa marcação e reprodutibilidade, mas são bastante onerosas. Com a maior demanda e concorrência, a tendência é haver o barateamento das mesmas.

Outra dificuldade é a necessidade para a análise de um sistema de microscopia de fluorescência com captura de imagens. Para cada fluorocromo é utilizado um filtro específico. Também é importante a experiência com o sistema de microscopia, pois a demora na captura das imagens pode resultar no desbotamento da fluorescência. Os programas específicos para captura e edição das imagens são ainda bastante dispendiosos (SIMÕES, 2000).

A metodologia FISH vem se consolidando na genética clínica tanto para confirmar alterações cromossômicas específicas quanto para detectar alterações mesmo quando a análise clássica não apresenta resultados satisfatórios.

Na oncologia as aplicações são crescentes, sendo utilizada para diferentes neoplasmas. Nas leucemias a combinação das técnicas de citogenética clássica e molecular proporciona resultados mais precisos e com maior rapidez, e por ser um método quantitativo, permite inclusive a detecção de doença residual mínima (SAGRILLO *et al.*, 2005).

As terapias-alvo moleculares constituem uma nova estratégia para o tratamento do câncer. Essas terapias foram desenvolvidas a partir do conhecimento da biologia tumoral que possibilitaram a caracterização de alvos celulares específicos. A primeira terapia-alvo usada na prática clínica foi o Gleevec® (*imatinib mesylate*), um inibidor de tirosina quinase que

inativa a proteína quimérica BCR-ABL, que é produzida quando há a formação do cromossomo Philadelphia. Outro exemplo de terapia-alvo é a utilização de trastuzumab (anticorpo monoclonal recombinante anti-*HER-2*) no câncer de mama, sendo indicada quando há superexpressão da proteína *HER-2* (ISMAEL *et al.*, 2007).

As terapias-alvo vêm revolucionando o tratamento do câncer, apresentando maior efetividade, uma vez que atuam nos alvos celulares específicos, e diminuem os efeitos colaterais.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer se configura como um importante problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a doença possa matar mais de 12 milhões de pessoas por ano até 2020 (<http://www.who.int/cancer/en/>).

Em células tumorais, um número significativo de alterações cromossômicas específicas vem sendo reconhecidas. A avaliação citogenética pode fornecer informações adicionais importantes para a estratificação do tumor e orientação terapêutica, proporcionando um diagnóstico diferenciado. A metodologia FISH, ou citogenética molecular, é particularmente útil na avaliação de tumores sólidos, onde a obtenção de metáfases é tecnicamente complexa e pouco eficiente (VARELLA-GARCIA, 2003).

A utilização da metodologia de FISH possibilita a obtenção de informações genômicas relevantes em células individualizadas, permitindo maior refinamento na caracterização das alterações presentes nos neoplasmas.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Avaliar a participação de mecanismos citogenéticos no processo carcinogênico através da análise cromossômica de células de câncer de mama e leucemia pela metodologia FISH.

3.2 Específicos

3.2.1 Utilizar a metodologia FISH para detecção de alterações cromossômicas numéricas e rearranjos específicos em núcleos interfásicos e metáfases de leucemias;

3.2.3 Determinar através da FISH o número de cópias dos cromossomos 8, 11 e 17 em núcleos interfásicos de células tumorais de mama;

3.2.3 Relacionar os resultados encontrados com o perfil anatomopatológico dos tumores mamários;

3.2.4 Comparar resultados obtidos com outros descritos na literatura para a construção de um conhecimento mais amplo da participação das alterações cromossômicas no processo neoplásico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Abordagem ética e experimental

Este trabalho faz parte de dois projetos mais amplos: “Avaliação Citogenética e Molecular de Neoplasias Hematológicas”, aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (316/04) e “Câncer de Mama: Avaliação de Parâmetros Informativos e Prognósticos nas Populações dos Estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina” aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob parecer 191/2003, e pelo CONEP, 365/2004.

A abordagem experimental foi realizada em amostras tumorais obtidas de pacientes com câncer de mama e com leucemia atendidos no Hospital Universitário/UFSC. A participação no estudo foi voluntária sendo previamente firmado um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 1, 2, 3 e 4). O estudo, realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Centro de Ciências Biológicas – UFSC.

4.2 Seleção dos pacientes

As amostras de tumores mamários foram obtidas durante o procedimento cirúrgico realizado no Hospital Universitário/UFSC. Realizou-se entrevista com intuito de obter dados familiares e epidemiológicos, através de questionário estruturado (Anexo 5). As demais informações clínicas foram obtidas através dos prontuários médicos.

As amostras de leucemias foram obtidas durante atendimento clínico pelo serviço de Hematologia do Hospital Universitário/UFSC.

4.3 Coleta de material

As amostras de tecido tumoral proveniente de câncer de mama foram coletadas por patologistas, no momento da cirurgia, e transferidas para microtubos, devidamente identificados, contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) (1,5ml), e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Citogenética do BEG/UFSC. O tamanho do fragmento tumoral fornecido variou entre 0,5 e 1,0 cm.

Para avaliação de leucemia foram obtidas amostras de sangue periférico e/ou medula óssea colhidas assepticamente em seringa heparinizada, e encaminhadas para o Laboratório de Citogenética do BEG/UFSC.

4.4 Processamento das amostras

As amostras de câncer de mama foram processadas em fluxo laminar. O tecido foi disposto sobre uma Placa de Petri contendo 0,5 – 1ml de meio de cultura RPMI 1640, à temperatura ambiente, e dissociado mecanicamente com o auxílio de agulha e bisturi/estilete. A seguir o material foi transferido para um tubo de centrifuga cônico, enxaguando-se a placa com novo meio e transferindo os resíduos remanescentes para o mesmo tubo. Os fragmentos maiores de tecido não dissociados foram descartados.

As amostras de leucemia foram processadas em fluxo laminar, sendo as células lavadas 2 vezes em 5 ml de meio RPMI 1640. Após a contagem foram implantadas 1×10^6 células/ml em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab). Foram realizadas culturas em quadruplicata (A,B,C e D) , em tubos com 5 ml de meio de cultura incubando-se durante 24 horas (A e B) e 48 horas (C e D) a 37°C, expostas à colchicina (Sigma) (100µl-16µg/ml) *overnight* (A e C) e durante 90 minutos (B e D), e ao tratamento com CRA (*chromosome resolution additive- Genial Genetics*). A seguir as células foram hipotonizadas por 13 minutos em solução de KCl 0,075M.

4.5 Fixação

O material processado foi centrifugado por 8 à 10min, o sobrenadante removido e adicionados, 4ml de fixador Carnoy (metanol e ácido acético 3:1, respectivamente), recém preparado. Repetindo a centrifugação, renovou-se o fixador mais duas vezes, sendo o material obtido armazenado em freezer a -20°C até o momento de sua utilização

4.6 Preparo das lâminas

As amostras armazenadas foram centrifugadas e realizada troca do fixador. A seguir a suspensão de células foi gotejada em lâminas de microscopia e secas ao ar. Foram utilizadas lâminas especiais de alta qualidade, previamente lavadas com detergente, incubadas *overnight* em solução de álcool-ácido (20% HCl 2N em etanol) e enxaguadas com água destilada gelada.

4.7 FISH

4.7.1 Pré- tratamento das lâminas

As lâminas devidamente identificadas foram submetidas a um pré-tratamento em solução de 2XSSC (NaCl / citrato de sódio) a 37°C, durante 5 minutos e enxaguadas em água

destilada por 1 minuto. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em uma série de álcoois em diferentes concentrações (70, 90 e 100%, 1 minuto cada).

4.7.2 Preparo da sonda

Neste estudo foram utilizadas as seguintes sondas:

- Sondas Vysis® LSI dupla cor dupla fusão para detecção dos rearranjos 15;17 e Abott e Poseidon® para detecção do rearranjo 9;22

- Satélites centroméricas: Vysis®: CEP 8 (8p11.1-q11.1), CEP11 (11p11.1-q11.1) e CEP 17 (17p11.1-q11.1) e Zytovision®: cromossomos CEP7 (7p11.1-q11.1) e CEP 8 (8p11.1-q11.1).

A preparação das sondas foi feita de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.3 Denaturação e hibridização

Foram aplicados 5µl da solução contendo as sondas sobre as lâminas pré-tratadas e vedadas com cola quente. A seguir realizou-se a codenaturação em placa aquecida a 75°C durante 5 minutos. Posteriormente as lâminas foram mantidas *over-night* em câmara úmida e escura a 37°C (LSI) ou 42°C (CEP) para hibridização das sondas.

4.7.4 Lavagem pós-hibridização e detecção

Após a incubação, as lâminas foram imersas em solução de lavagem pós-hibridização a 37°C, onde foram removidas as lamínulas, e incubadas nesta solução durante 2 minutos na primeira lavagem e 2 minutos na segunda lavagem. A seguir, as lâminas foram desidratadas em uma série de álcoois em concentrações crescentes (70, 90 e 100%, 1 minuto cada) e secas ao ar. Na etapa seguinte, contra-coloração, houve a coloração do DNA nuclear aplicando-se 10µl de DAPI/antifade (0,02µg/ml) (VYSIS) sobre a lâmina, recobrimo com lamínula.

4.7.5 Análise da FISH

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX-41, com sistema de iluminação de vapor de mercúrio (HBO 100), utilizando-se objetiva 40X (para *scanning*) e 100X com imersão em óleo. Utilizou-se filtros U-MWU2 330-385 420 400 para visualização da cor azul (DAPI), U-MWG2 510-550 590 570 para a cor vermelha e U-MWB2 460-490 520IF 500 para a cor verde e filtro triplo (U-DM-DA/FI/TX2*3) para a visualização das três cores simultaneamente. Em cada amostra foram analisados, quando possível, 100 núcleos interfásicos, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente na lâmina, enumerando-se

os sinais fluorescentes. As imagens foram capturadas com câmara digital colorida refrigerada 3.3 mpixel QCOLOR3C (Qimaging), utilizando o programa Qcaptura Pro 5.1 da QimagingTM. Os resultados foram expressos de acordo com a nomenclatura proposta pelo ISCN 2005.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das Amostras de tumores mamários

As amostras de neoplasias mamárias foram colhidas no ano de 2007 durante o procedimento cirúrgico, de acordo com a orientação clínica, incluindo a mastectomia (remoção de toda a mama) ou cirurgia conservadora (remoção apenas do tumor e de uma porção do tecido circunvizinho). Foram avaliadas amostras de cinco pacientes, com idades variando entre 39 e 56 anos, como apresentado na Tabela 1. A média das idades foi de 47,8 anos. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2008), a idade continua sendo um dos fatores de risco mais importantes para o câncer de mama, sendo a incidência relativamente rara antes dos 35 anos de idade, com aumento rápido e progressivo acima desta faixa etária. Chama atenção na amostra estudada a presença de mulheres jovens, amostras 70 e 83, com 39 e 30 anos respectivamente no momento da cirurgia.

Tabela 1: Idade e história de câncer em parentes de primeiro grau nas pacientes avaliadas.

Paciente	Idade	História de câncer em familiares (1º Grau)
70	39	Sim
76	57	Sim (câncer de mama)
77	57	Não
83	30	Sim
93	56	Não

A maioria dos casos de câncer de mama são casos esporádicos e não têm associação com história familiar (VIEIRA *et al.*, 2008). No entanto, a história familiar do câncer de mama é um fator de risco bem estabelecido, sendo que 5 a 10% dos casos de câncer de mama apresentam recorrência familiar (WEI *et al.*, 2005). Cerca de 80% dos casos de câncer de mama hereditário ocorrem devido a mutações nos genes *BRCA1* (40-45%) ou *BRCA2* (35-40%) , admite-se que deve haver outros genes associados à hereditariedade do câncer de mama (ROSEN *et al.*, 2003). Algumas famílias apresentam história de câncer hereditário, acometendo diversos tecidos, podendo o câncer de mama se manifestar em alguns indivíduos, um exemplo é a síndrome de Li-Fraumeni, decorrente da mutação germinativa do gene *p53* (DANTAS *et al.*, 2009)

Os casos hereditários se caracterizam pelo desenvolvimento precoce da doença, e o aparecimento de diversos focos tumorais (WEI *et al.*, 2005). Ambos *BRCA1* e *BRCA2* são

genes supressores tumorais e localizam-se nos cromossomos 17 e 13, respectivamente (ALVARENGA *et al.*, 2003). Mulheres com mutação no gene *BRCA1* tem risco de 80-90% de desenvolver câncer de mama (AL-MULLA *et al.*, 2009), enquanto mulheres que apresentam mutação no gene *BRCA2* possuem um risco de 85% (ALVARENGA *et al.*, 2003).

Na amostra estudada, três pacientes, (Tabela 1), relataram história familiar de câncer sendo que uma delas (amostra 83) apresentou dois focos de crescimento tumoral.

5.2 Avaliação Anatomopatológica e Imunohistoquímica dos tumores mamários

A Tabela 2 apresenta o resultado da avaliação anatomopatológica e imunohistoquímica, realizada no Laboratório de Anatomia Patológica e Patologia Geral do HU-UFSC. Em todas as amostras foi diagnosticado Carcinoma Ductal Invasivo, o qual é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos, caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter potencialidade de originar metástases (VIEIRA *et al.*, 2008).

Os tumores mamários são também classificados em sua gradação histológica pelos critérios propostos por Bloom e Richardson e modificados por Elston e Ellis (1991), havendo relação entre a histologia e o prognóstico. Por estes critérios, das cinco pacientes da amostra, quatro apresentaram grau histológico 3 e apenas uma grau histológico 2.

A presença de células tumorais nos linfonodos é considerada um indicador da disseminação hematogênica do tumor. Metástases em linfonodos axilares aparecem como o fator isolado mais importante para definir o prognóstico do câncer de mama e representa a base de decisões terapêuticas (BRAUN *et al.*, 2005).

Quatro pacientes apresentaram linfonodos positivos na cadeia linfática axilar, e apenas uma obteve resultado negativo nesta avaliação. No entanto, outros estudos sugerem que o envolvimento de linfonodos pode não ser acurado para a detecção de disseminação hematogênica de células tumorais, nem a disseminação hematogênica está necessariamente associada ao acometimento de linfonodos, considerando a presença de micrometástases em medula óssea uma avaliação mais fidedigna (BRAUN *et al.*, 2005).

Outro procedimento informativo para avaliar o estadiamento do tumor é a imunohistoquímica (IHQ). A IHQ é um dos principais métodos para avaliar o perfil de expressão protéica em anatomia patológica. Três marcadores moleculares são rotineiramente utilizados na patologia clínica para câncer de mama: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e o receptor de fator de crescimento epidermal (*HER-2*). Estes marcadores são fundamentais para estratificar os diferentes grupos tumorais, complementando as demais

informações como tamanho tumoral, grau histológico, positividade de linfonodos e estágio nodular (PAYNE *et al.*, 2008).

Tabela 2: Diagnóstico Anatomopatológico e Imunohistoquímica (IHQ) de neoplasias mamárias.

Anátomopatológico				IHQ		
Amostra	Carcinoma	Grau	Linfonodos	c-erbB-2 (HER2)	Receptor de estrógeno (ER)	Receptor de progesterona (PR)
70	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Positivo	0	Negativo	Negativo
76	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Negativo	0	Negativo	Negativo
77	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Positivo	0	Positivo	Positivo
83	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Positivo	+3	Positivo	Positivo
93	Carcinoma Ductal Invasivo	2	Positivo	*	Positivo	*

*Os parâmetros não avaliados pelo desbaste da amostra.

A amplificação do gene de fator de crescimento epidermal humano (HER-2 ou c-erbB-2) e/ou a superexpressão da proteína *HER-2* está associada ao mau prognóstico em tumores mamários tanto com linfonodos positivos quanto negativos (HYUN *et al.*, 2008). A expressão protéica do *HER-2* pode ser avaliada pela IHQ através do uso de anticorpos que reconhecem o domínio extracelular desta proteína (ANDRÉ *et al.*, 2005).

A terapêutica com trastuzumab (anticorpo monoclonal recombinante anti-*HER-2*) é indicada para os tumores positivos para o *HER-2*. (ANDRÉ *et al.*, 2005). No grupo amostral avaliado apenas uma paciente apresentou expressão da proteína *HER-2* com *score* +3 .

A expressão dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona), pelas células neoplásicas, representa um parâmetro biológico com significado preditivo e prognóstico independente (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Em relação ao receptor de estrogênio (ER), a avaliação realizada foi positiva em três amostras sendo duas delas referentes a pacientes acima de 50 anos, corroborando os dados da literatura. De acordo com Payne *et al.* (2008), aproximadamente 80% das mulheres acima de 50 anos apresentam tumores positivos para o ER. O ER é considerado o marcador mais eficiente para estratificação de tumores mamários, utilizado para a caracterização do prognóstico e orientação de terapias hormonais. Os tumores positivos para ER estão associados a uma maior sobrevida livre de doença e, também, a uma maior probabilidade de resposta à terapia hormonal (EISENBERG, 2001). A expressão do receptor de progesterona (PR) é uma evidência indireta da atividade transcricional dos RE, tendo forte correlação com o prognóstico, juntamente com RE (AMENDOLA & VIEIRA,

2005). O PR foi avaliado em quatro das cinco amostras, sendo duas positivas e duas negativas.

5.3 Avaliação FISH dos tumores mamários

Alterações no número de cromossomos acarretam alterações na expressão e a função gênica, produzindo um desequilíbrio protéico na célula. Nas neoplasias, a aneuploidia freqüentemente envolve cromossomos com genes relacionados ao desenvolvimento e progressão da doença (CLIMENT *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi realizada a enumeração dos cromossomos 8, 11 e 17 nas células dos tumores de mama, através da metodologia FISH.

Nestes cromossomos localizam-se genes críticos para o processo neoplásico, o oncogene *c-MYC* (8q24), o gene de fator de crescimento epidermal humano (*HER-2* -17q21), os genes supressores tumorais *TP53* (17p13) e *BRCA1*(17q21), o gene do receptor de progesterona (11 q22–23) entre outros, podendo haver uma associação entre a alteração do número de cópias desses cromossomos e alteração na expressão destas e outras proteínas, influenciando a agressividade do tumor.

Em núcleos interfásicos de células normais, através da metodologia FISH com sondas centroméricas, devem ser observados dois sinais de cada sonda. Mais de duas marcações no núcleo indicam ganho cromossômico e, no caso de apenas uma sinalização, a monossomia. A perda de informações genéticas devido à monossomias é menos tolerada do que o ganho de informações devido à poliploidia (TORRES *et al.*, 2008).

Na Tabela 3 observam-se os resultados obtidos através da FISH nas amostras de tumores mamários.

Na amostra 70 houve alteração no número de cópias do cromossomo 8, com polissomia em 96% das células analisadas, sendo 41% tetrassomias. Em relação ao cromossomo 11 observou-se a polissomia em 57,3% das células, sendo 48,8% trissomias. Na avaliação do cromossomo 17, 67,9% das células não apresentaram alteração quanto a número de sinais e em 16% foi detectada a monossomia.

Na amostra 76 o número de cópias do cromossomo 8 variou entre 1 e 4, assumindo valores de aneuploidia em 95% das células, sendo 88% trissômicas. Nesta mesma amostra, foi detectada a presença de sinais fluorescentes, correspondentes ao centrômero do cromossomo 17 estando o número de cópias anormal em 20 dentre os 100 núcleos analisados, 14 desses evidenciando a monossomia. A visualização dos sinais pôde ser melhor interpretada com a

sobreposição das imagens capturadas como apresentado na Figura 1. Não houve material suficiente para a avaliação com a sonda do cromossomo 11.

A aneuploidia do cromossomo 8 na amostra 77 foi observada em 96,6% dos núcleos, quase a totalidade das células analisadas, sendo 68,8% delas tetrassômicas. Observou-se ainda 24% das células alteradas numericamente quanto à presença e/ou ausência do cromossomo 17, sendo 19% monossômicas. Não houve material suficiente para a avaliação com a sonda do cromossomo 11.

Na amostra 83 observou-se alteração no número de cópias do cromossomo 8 em 63,9% das células, sendo 42,6% dessas polissômicas. Das 155 células avaliadas em relação ao cromossomo 11, 72 (46,5%) não apresentaram alteração, porém um grande número de células monossômicas foi detectado (21,3%). Na mesma amostra, 75% das células apresentaram polissomia para o cromossomo 17 com a grande maioria dessas sendo trissômicas (41,6%).

Tabela 3: Quantidade de sinais amplificados nos núcleos interfásicos analisados.

Amostra	Nº Sinais	1	2	3	4	5	6	7	8 ou mais	Resultado Segundo ISCN
70	Cromossomo 8	-	4,08%	33,67%	41,83%	17,34%	3,06%	-	-	nuc ish (D8Z1) x2 [4], x3 [33], x4 [41], x5 [17], x6[3]
	Cromossomo 11	7,31%	35,36%	48,78%	6,10%	2,44%	-	-	-	nuc ish (D11Z1) x 1[6], x2 [29], x3 [40], x4 [5], x5 [2],
	Cromossomo 17	16,05%	67,9%	8,64%	3,70%	2,47%	1,23%	-	-	nuc ish (D17Z1) x 1[13], x2 [55], x3 [7], x4 [3], x5 [2], x6[1]
76	Cromossomo 8	1%	5%	88%	6%	-	-	-	-	nuc ish (D8Z1) x1 [1, x2 [5], x3 [88], x4 [6]
	Cromossomo 17	14%	80%	6%	-	-	-	-	-	nuc ish (D17Z1) x 1[14], x2 [80], x3 [6]
77	Cromossomo 8	-	3,12%	15,62%	64,58%	8,33%	-	2,08%	-	nuc ish (D8Z1) x2 [3], x3 [15], x4 [62], x5 [8], x7 [2]
	Cromossomo 17	19	76	2	3	-	-	-	-	nuc ish (D17Z1) x 1[19], x2 [76], x3 [2], x4 [3]
83	Cromossomo 8	21,31%	36,06%	22,95%	8,20%	4,92%	3,28%	3,28%	-	nuc ish (D8Z1) x1 [13], x2 [22], x3 [14], x4 [5], x5 [3], x6 [2], x7 [2]
	Cromossomo 11	21,29%	46,45%	18,06%	10,97%	2,58%	-	0,64%	-	nuc ish (D11Z1) x 1[33], x2 [72], x3 [28], x4 [17], x5 [4], x7[1]
	Cromossomo 17	4,16%	20,83%	41,66%	25%	-	8,33%	-	-	nuc ish (D17Z1) x 1[1], x2 [5], x3 [10], x4 [6], x6 [2]
93	Cromossomo 8	5%	35%	10%	15%	14%	6%	1%	14%	nuc ish (D8Z1) x1 [5], x2 [35], x3 [10], x4 [15], x5[14], x6 [6], x7 [1], x8
	Cromossomo 11	11,43%	32,86%	50%	4,28%	-	1,43%	-	-	nuc ish (D11Z1) x 1[8], x2 [23], x3 [35], x4 [3], x6 [1]
	Cromossomo 17	2,77%	16,66%	44,44%	33,33%	1,38%	-	1,38%	-	nuc ish (D17Z1) x 1[2], x2 [12], x3 [32], x4 [24], x5 [1], x7 [1]

Os resultados obtidos na amostra 93 evidenciaram alteração no número de cópias dos cromossomos 8, 11 e 17, detectando-se a polissomia em 60%, 55,7% e 80,5% das células analisadas, respectivamente (Figura 2). Na avaliação do cromossomo 8 observou-se uma grande variação no número de sinais chegando a 14 em uma das células avaliadas. Dentre as células que apresentaram polissomia para os cromossomos 11 e 17, a grande maioria foi trissômica, 50% e 44,4% respectivamente.

Considerando os diferentes tumores de mama avaliados neste estudo, foi observada a polissomia do cromossomo 8 em 363 (80,5%) dos 451 núcleos avaliados, sendo a monossomia encontrada em três das cinco amostras (Figura 3). Estudos similares evidenciaram a polissomia deste cromossomo em 12-45% dos casos de câncer de mama (RODRIGUEZ-PINILLA *et al.*, 2007). No cromossomo 8 localiza-se o oncogene *c-MYC* (8q24) que apresenta um importante papel na indução e progressão de linfomas, câncer de pulmão e câncer de mama (GRUSHKO *et al.*, 2004). Estudos com Hibridação Genômica Comparativa (CGH) têm demonstrado que este cromossomo é um alvo freqüente de perdas e ganhos no câncer de mama (RUMMUKAINEN *et al.*, 2001).

A amplificação do gene *c-MYC* tem sido relatada como biomarcador de mau prognóstico em tumores de mama e associada à agressividade do tumor, incluindo instabilidade genética, alto grau histológico, linfonodos positivos, ER e PR negativos (GRUSHKO *et al.*, 2004 e RODRIGUEZ-PINILLA *et al.*, 2007). Neste estudo pode-se observar a relação entre a polissomia do cromossomo 8 com alto grau histológico e linfonodos positivos, porém a relação com ER e PR negativos só pode ser observada em 2 das cinco amostras.

Nas cinco amostras avaliadas, 59,6% dos núcleos apresentaram número anormal de sinais do cromossomo 11, sendo que 47 (15,3%) dos 307 núcleos avaliados evidenciaram monossomia (Figura 4). O gene que codifica o PR localiza-se no cromossomo 11 e, freqüentemente, apresenta alterações no câncer de mama (MIALHE *et al.*, 1999). Tsukamoto *et al.* (2001), através de FISH, demonstraram que 95,9% dos tumores invasivos de mama apresentam alterações em pelo menos um desses três cromossomos 1, 11, ou 17. Os dados obtidos nesse estudo corroboram os dados de Persons *et al.* (1996) que relataram uma significativa correlação entre a polissomia do cromossomo 11 e linfonodos positivos.

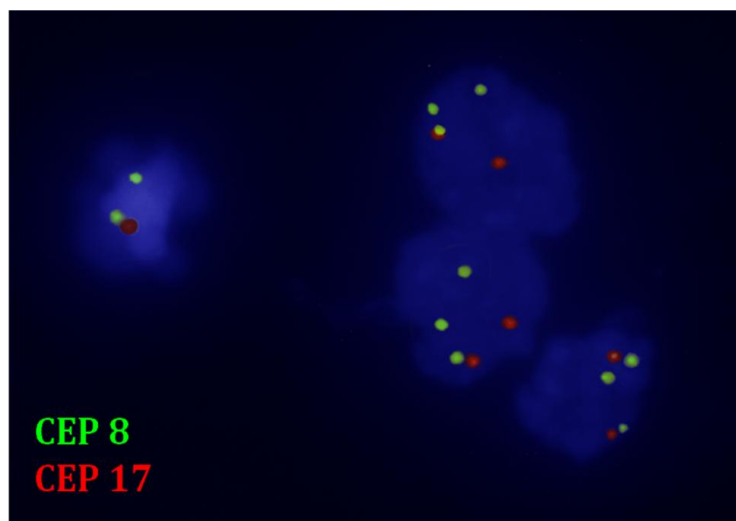


Figura 1: Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 76, utilizando sonda CEP 8 (verde) e CEP 17 (vermelha), aumento 1000X.

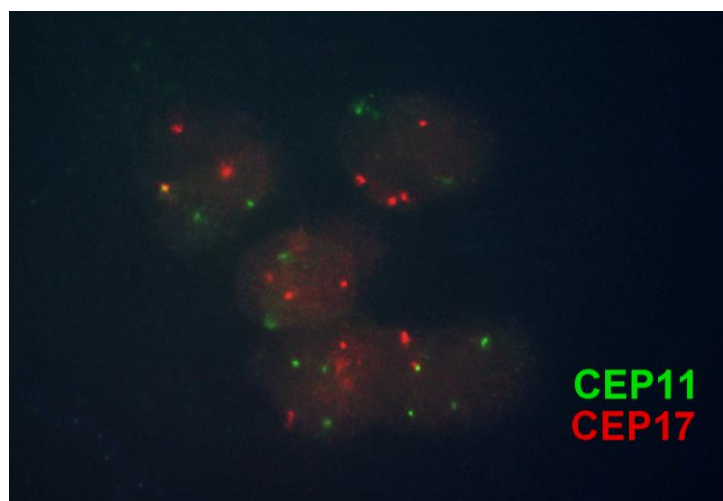


Figura 2: Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 93, utilizando sonda CEP 11 (verde) e CEP 17 (vermelha), aumento 1000X.

Em relação ao cromossomo 17, a maioria dos núcleos avaliados (60,5%) apresentou número normal de sinais. A monossomia foi detectada nas cinco amostras avaliadas, correspondendo a 49 (13%) dos 377 núcleos avaliados, enquanto a polissomia apareceu em 26,5% núcleos (Figura 5). Watters *et al.* (2003) encontraram em seus estudos valores similares de monossomia do cromossomo 17.

O cromossomo 17 contém vários genes associados ao câncer de mama como por exemplo o proto-oncogene *HER-2* e os genes supressores tumorais *TP53* (17p13) e *BRCA1* (17q21). Alterações no número de cópias deste cromossomo são comuns (REINHOLZ *et al.*, 2009) e tem sido associadas a mau prognóstico ou metástases em tumores de mama (LAL *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que mutações no gene *BRCA1* são freqüentemente

acompanhadas pela monossomia do cromossomo 17 (WEI *et al.*, 2005). Watters *et al.* (2003) correlacionaram anormalidades da p53 com a polissomia do cromossomo 17 em tumores mamários (SIGURDSSON *et al.*, 2000).

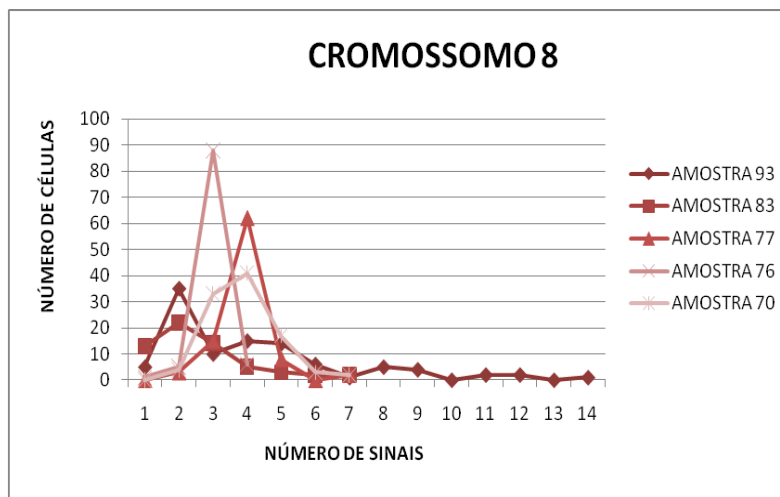


Figura 3: Amplificação da região centromérica do cromossomo 8 nas amostras avaliadas.

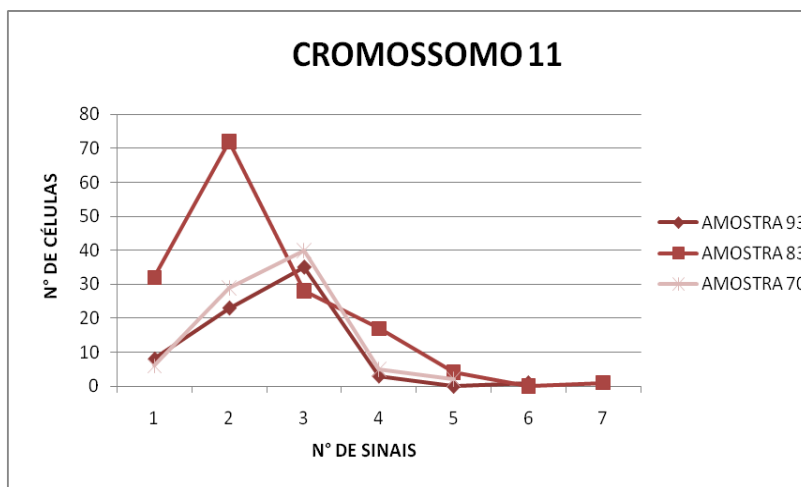


Figura 4: Amplificação da região centromérica do cromossomo 11 nas amostras 70, 83 e 93.

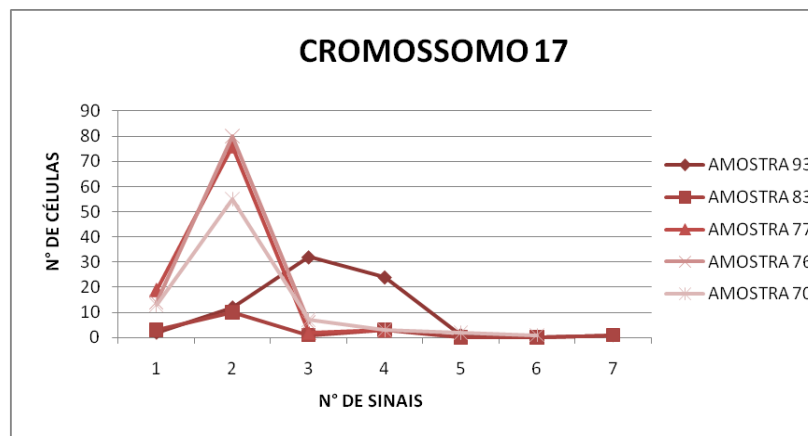


Figura 5: Amplificação da região centromérica do cromossomo 17 nas amostras avaliadas.

Um aumento no número de cópias do cromossomo 17 também resultaria no aumento de cópias do gene *HER-2* o que pode conduzir a superexpressão da proteína *HER-2* em tumores mamários, sem que haja necessariamente a amplificação gênica (HYUN *et al.*, 2008). LAL *et al.* (2003) evidenciaram um aumento mais significativo no número de cópias do cromossomo 17 em tumores com amplificação do gene *HER-2* do que em tumores sem essa mesma amplificação. Na amostra 83, a qual apresentava superexpressão da proteína *HER-2*, a maioria das células apresentou 3 ou mais cópias do cromossomo 17, porém a amplificação do gene *HER-2* não foi avaliada.

Estes resultados evidenciam que as alterações numéricas dos cromossomos avaliados são recorrentes nos tumores mamários. No entanto, neste estudo, não foi possível estabelecer uma relação entre os achados citogenéticos e a agressividade do tumor. Sugere-se que a aneuploidia poderia facilitar o desenvolvimento neoplásico produzindo um desequilíbrio protéico.

A avaliação de um número maior de tumores, e a utilização de sondas para outros cromossomos poderia fornecer subsídios para averiguar esta relação adequadamente.

Houve também heterogeneidade entre as células da mesma amostra, caracterizando a ocorrência de instabilidade cromossômica (CIN). A utilização da FISH é importante para a caracterização da CIN, uma vez que as técnicas moleculares rotineiramente utilizadas avaliam moléculas obtidas a partir de um pool de células, enquanto pela FISH cada célula é avaliada individualmente (GEIGL *et al.*, 2008).

Os processos moleculares que acarretam a CIN ainda são obscuros, mas defeitos nos componentes dos *checkpoints* mitóticos e na maquinaria que controla a coesão das cromátides irmãs podem contribuir. A conexão dos cinetócoros às fibras do fuso também pode ser determinante, assim como a alteração no número de centríolos, que poderia acarretar defeitos

na ligação das cromátides e segregação dos cromossomos (HOLLAND & CLEVELAND, 2009).

5.4 Caracterização e análise FISH das amostras de leucemia

As leucemias se destacam como neoplasias que apresentam alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais altamente consistentes e específicas, envolvendo genes que, uma vez alterados qualitativa ou quantitativamente, atuam como fatores de iniciação e progressão neoplásicas. Além de contribuírem para a compreensão da base genética destas patologias, essas alterações cromossômicas têm importância fundamental no diagnóstico e prognóstico dos pacientes (FETT-CONTE *et al*, 2000).

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), embasada em publicações científicas e na experiência de mais de 100 patologistas, clínicos e cientistas, publicou um novo sistema de classificação para as neoplasias hematopoéticas e linfóides. O princípio básico dessa classificação é a utilização das diversas informações disponíveis, incluindo características morfológicas, genéticas, imunofenotípicas, biológicas e clínicas, para a caracterização dos tumores hematopoéticos e linfóides (PAIETTA, 2003).

Segundo a classificação da OMS as seguintes anormalidades citogenéticas específicas recorrentes podem ser observadas em LMA: t(8;21), t(15;17), inv(16), rearranjos 11q23. Além dessas alterações também podem ser observadas +8, 5/5q-, -7/7q-(HARRIS *et al.*, 1999).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são caracterizadas por displasias morfológicas, função celular defectiva, instabilidade genética e hematopoese ineficaz, resultando clinicamente em citopenias no sangue periférico. Os pacientes com SMD não apresentam boa resposta a quimioterapia podendo evoluir para uma LMA. Entre as alterações cromossômicas encontradas em SMD pode-se citar -5/5q-, -7/7q-, +8, 11q- etc. (HARRIS *et al.*, 1999).

A avaliação citogenética é decisiva para a classificação das leucemias, fornecendo subsídios indispensáveis para a orientação terapêutica. A metodologia FISH em núcleos interfásicos apesar de possibilitar a caracterização das alterações específicas não permite a detecção de alterações adicionais que podem influenciar o prognóstico. Por isso recomenda-se a utilização de FISH com metodologia complementar a avaliação citogenética convencional (CHERRY *et al.*, 2003).

Neste estudo foram avaliadas 11 amostras de leucemia obtidas no período de 2006 a 2008, sendo 7 de pacientes do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idade variando de 20 a 57 anos. A média das idades foi de 40 anos.

A avaliação através de FISH foi utilizada como complementação da análise citogenética convencional, ou nos casos em que não foram obtidas metáfases adequadas para análise citogenética. Realizou-se a enumeração dos cromossomos 7, 8 e 11 e também a detecção das translocações t(15;17) e t(9;22). A Tabela 4 apresenta informações gerais e a indicação clínica dos pacientes.

Tabela 4: Número de registro no Laboratório de Citogenética, idade, sexo e indicação clínica dos pacientes.

Nº lab	Idade/Sexo	Indicação Clínica
6804	37 M	LMA
0806	? M	LA
0507	57 F	PANCITOPENIA
2507	37 F	LLA
3507	38 M	LMA
4007	44 F	LMA
4607	40 M	LMA
0208	52 F	TROMBOCITOPENIA
2308	48 M	LMA
2508	28 M	LLA
2708	20 M	LA

Das amostras analisadas, nove foram encaminhadas com indicação clínica de leucemia aguda (mielóide ou linfóide) e duas com outras alterações hematológicas (pancitopenia e trombocitopenia). As leucemias agudas caracterizam-se por um desequilíbrio entre proliferação e maturação, sendo que as células do clone leucêmico continuam a proliferar sem diferenciação ocasionando um acúmulo de blastos (BAIN, 2003).

A Tabela 5 apresenta os resultados da avaliação FISH das amostras de leucemia e as sondas utilizadas.

A detecção da translocação 15;17 é importante no acompanhamento dos pacientes durante e após o tratamento. Neste estudo, a presença da t(15;17) foi avaliada em cinco amostras, sendo três delas (6804, 4007 e 4607) de pacientes ao final do tratamento. Na realização de FISH utilizou-se sonda LSI dupla cor dupla fusão para detecção da translocação. A fusão dos dois genes (*PML* e *RARA*) produz uma fluorescência com sinais coincidentes (verde/vermelho). Assim, uma célula normal apresenta dois sinais verdes e dois vermelhos

distintos; uma célula com a translocação t(15;17) mostra um sinal verde, um sinal vermelho e um sinal verde/vermelho co-localizados.

Tabela 5: Resultados do cariótipo com bandas e cariótipo com FISH das amostras de leucemia, segundo o ISCN (2005)

Amostra	Cariótipo com Bandas	Sonda	Cariótipo com FISH
6804	46,XY [27]	LSI PML/RARA	46, XY [4] nuc ish (PML x2) (RARA x2) [64]
0806	46,XY [1] / 46,XY, +D,-F[1] / 46,XY, 17q-, csb3q[1] / 47,XY,+8[1] / 48,XY, -21, + C,+C,+C[1] / 48,XY, +D,+D,+C,-18[1] / 48,XY, +F,+C[1] / 48,XY,+13,+11[1]	CEP 8	nuc ish (D8Z1) x1 [8], x2 [14], x3 [4], x4 [6], x6 [1], x7 [1]
0507	46, XX [4] / 46, XX, del 7 (q32-qter) [1] / 46, XX, 5p-, +5p-, -C [1] / 46,XX 5p- [1] / 46,XX, 8q-, 13q- [1] / 45,XX, -22 [1] / 45,XX,-14, 6q-, 20p- [1]	CEP 7	nuc ish (D7Z1) x1 [15], x2 [34], x3 [3], x4 [3], x7 [1]
2507	46,XY [3] / 46~47,XY, del 6q (q22-qter) [4], + del 6q (q22-qter) [1] [cp5] / 46-47,XY, del 11 (q23-qter) [4], + iso 16q [1] [cp 4] / 45,X, -Y [1]	CEP 11	nuc ish (D11Z1) x1 [24], x2 [68], x3 [22], x4 [8], x5 [3], x7[1]
3507	46,XY,t(15;17)(q22;q21) [20], del 13 (q21-qter) [2], del 7 (q22-q34) [1] [cp 20]	LSI PML/RARA	46, XY, t (15;17) [11] nuc ish (PML x3), (RARA x 3), (PML con RARA x2) [57]
4007	46,XX [6] / 46,XX, t (15;17)(q22;q21) [2]	LSI PML/RARA	46, XX[2]/46,XX,t (15;17) [1] nuc ish (PML x2) (RARA x2) [12]/ nuc ish (PML x3), (RARA x 3), (PML con RARA x2) [1]
4607	46,XY [10] / 46,XY, t (15;17)(q22;q21)[2]	LSI PML/RARA	nuc ish (PML x2) (RARA x2) [57]/ nuc ish (PML x3), (RARA x 3), (PML con RARA x2) [1]
0208	Sem Metáfases	LSI BCR/ABL	nuc ish 9q34 (ABL x1); 22q11.2 (BCRx1); (ABL con BCR x2) [6/25]
2308	46,XY [20]	LSI PML/RARA	nuc ish (PML x2) (RARA x2) [76]/ nuc ish (PML x3), (RARA x 3), (PML con RARA x2) [24]
2508	46,XY [3] / 46,XY,del 7(q2-q34)[1]	LSI BCR/ABL	nuc ish (ABL x2) (BCRx2) [18]/ nuc ish (ABL x3) (BCRx3) (ABL con BCR x2) [12]
2708	Sem Metáfases	LSI BCR/ABL	nuc ish (ABLx2) (BCR x2) [49]/ (ABLx2) (BCR x3) [24]/ (ABLx2) (BCR x2) (ABL con BCR x1) [1]

Na amostra 3507, a FISH confirmou a presença da t(15;17) nos núcleos e metáfases analisados (Figura 6). Este paciente apresentava também outras alterações cromossômicas como a deleção dos cromossomos 7, 13 e 20, Estas alterações adicionais podem influenciar o prognóstico. Assim, é importante a complementação da análise por FISH pela avaliação citogenética clássica.

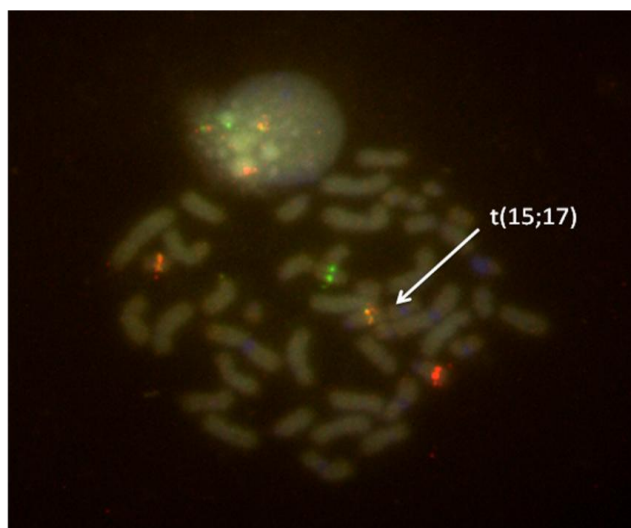


Figura 6: Presença da translocação 15;17 na amostra 3507. Foi utilizada sonda LSI *PML(verde)/RARA(vermelho)*, aumento 1000x .

Na amostra 2308, através da citogenética clássica não foi detectada a translocação 15;17, no entanto pela análise FISH o rearranjo foi detectado em 24% dos núcleos avaliados, confirmando a sensibilidade da técnica para a detecção de rearranjos específicos.

Nas amostras de pacientes ao término do tratamento foram avaliados núcleos e metáfases sendo a translocação detectada em apenas um núcleo na amostra 4607 e em um núcleo e uma metáfase da amostra 4007.

Embora seja mais freqüente nos casos de LMC, a t(9;22) é observada em diversos tipos de leucemias e de outras neoplasias. Tanto na LLA quanto na LMC com t(9;22), o gene *ABL* é translocado do cromossomo 9 para o 22. Entretanto, os pontos de quebra no gene *BCR* podem variar. Na LMC, o gene *ABL* se junta à região de 5,8-kb no cromossomo 22 denominada de região de agrupamentos de pontos de quebra (break cluster region = bcr), que se encontra em um gene maior, *BCR*. Já nos casos de LLA, o proto-oncogene *ABL* une-se à região 5' do bcr, dentro do gene *BCR* (HERMANS et al., 1987). Neste estudo, detectou-se a t(9;22) em nas amostras 0208 e 2508.

A análise da amostra 2708 foi inconclusiva, pois parte das células apresentou 3 sinais *BCR* e apenas 2 sinais *ABL*, sugerindo que houve translocação do cromossomo 22, mas com um parceiro diferente do cromossomo 9, o qual estava íntegro.

Nas demais amostras avaliadas neste estudo (0806, 0507 e 2507) a metodologia FISH foi aplicada para complementar a citogenética clássica, visando detectar outras alterações recorrentes nas leucemias.

Na amostra 0507 houve a enumeração do cromossomo 7 sendo verificada a monossomia em 26,78% das células, mais freqüente do que a polissomia (12,5%). A

monossomia ou deleção de parte do cromossomo 7 é encontrada frequentemente em desordens mielóides, ocorrendo em SMD e LMA (BABICKA *et al.*, 2006). Geralmente esta alteração está associada a um prognóstico ruim, resistência à quimioterapia (FETT-CONTE *et al.*, 2000) e progressão para LMA em casos de SMD (CHERRY *et al.*, 2003).

Os rearranjos envolvendo 11q, ou a del11q, são indicativos de mau prognóstico. O braço longo do cromossomo 11 é rico em genes e as alterações estruturais estão concentradas na banda q23 com uma miríade de malignidades hematológicas (CHAUFFAILLE *et al.*, 2006). Mais especificamente, na região 11q23, está mapeado o proto-oncogene *MLL* que codifica uma proteína que parece ter um papel na regulação da transcrição (FETT-CONTE *et al.*, 2000) e rearranjos nesta região estão correlacionados a leucemogênese. Na amostra 2507, verificamos um número de cópias do cromossomo 11 normal em 53,9% dos núcleos avaliados, sendo a monossomia detectada em 19,05% dos núcleos. Para esta avaliação foram utilizadas sondas centroméricas do cromossomo 11, as quais marcam o centrômero do cromossomo, mas não possibilitam a detecção de alterações estruturais.

A amostra 0806 foi avaliada previamente através da citogenética clássica onde verificou-se um cariótipo complexo. Esse tipo de cariótipo demonstra um acúmulo de alterações progressivas e maior agressividade, associando-se a prognóstico extremamente desfavorável. Nestas células foi detectada monossomia do cromossomo 8 em 23,53% dos núcleos e a polissomia em 35,3% dos núcleos avaliados. A trissomia do cromossomo 8 é uma alteração numérica recorrente em alguns tipos de leucemia (MA *et al.*, 2009). O significado do ganho de um cromossomo 8 ainda não está completamente entendido porém, sabe-se que alterações neste cromossomo podem afetar a expressão do gene *c-MYC* alterando a proliferação e a diferenciação das células linfóides (CHAUFFAILLE *et al.*, 2006).

Muitas vezes a análise através da FISH possibilita a caracterização de alterações em amostras que não apresentaram metáfases, como é o caso da amostra 0208 e 2708. A análise com FISH não substitui a análise citogenética clássica, mas pode fornecer informações clínicas relevantes com maior agilidade, referentes a um número maior de células do que seria possível pela análise clássica.

Verificamos também a importância da avaliação por FISH para o controle pós-tratamento, quando há dificuldade para obtenção de metáfases e necessidade de análise de um grande número de células para detecção da doença residual.

6. CONCLUSÕES

As perspectivas da avaliação citogenética ampliam-se com a utilização das técnicas moleculares como a FISH, que agregam agilidade, especificidade e sensibilidade, mas que ainda são proibitivas em função do alto custo dos insumos e equipamentos necessários para sua realização.

O aumento da compreensão da biologia do câncer possibilita avanços clínicos no seu tratamento, principalmente na melhoria de sistemas de rastreamento e no tratamento da doença ainda em estágio precoce. A detecção de marcadores moleculares é de grande importância e podem apontar novas estratégias para tratamento e prevenção do câncer.

Os dados obtidos neste estudo confirmam a participação de processos citogenéticos no desenvolvimento neoplásico.

Foi padronizada a metodologia de hibridização “*in situ*” fluorescente (FISH), associada à dinâmica de análise ao microscópio de epifluorescência e interpretação dos resultados. A alta sensibilidade da técnica possibilitou a detecção de alterações no número de cópias dos cromossomos estudados tanto nos tumores mamários quanto nas amostras de leucemia, através de sondas centroméricas e, a detecção das translocações t(9;22) e t(15;17) nas amostras de leucemia através de sondas locus-específicas.

Nas amostras de tumores mamários os resultados evidenciaram maior número de células aneuplóides para os cromossomos 8 e 11, o que pode acarretar desequilíbrio nos genes localizados nestes cromossomos, especialmente o oncogene *c-MYC* e o gene do receptor de progesterona nas células. A associação entre o número de cromossomos 17 encontrado e a superexpressão do gene *HER-2* não pode ser avaliada neste estudo.

Os resultados da avaliação das amostras de leucemia confirmam a importância do estudo citogenético tanto no pré-tratamento, possibilitando a estratificação e orientação terapêutica adequada, como no pós-tratamento para auxiliar na detecção da doença residual mínima, verificando-se concordância entre o cariótipo inicial dos pacientes e a evolução clínica dos mesmos. A análise por FISH não substitui a análise citogenética clássica, mas proporciona agilidade para a detecção de alterações específicas.

Pesquisas futuras e estudos citogenéticos mais detalhados sobre instabilidade cromossômica e aneuploidia deverão contribuir para a descoberta de eventos iniciais da tumorigênese, bem como estabelecer suas funções na iniciação e progressão tumoral.

7. REFERÊNCIAS

- AL-MULLA, F., BLAND, J.M., SERRATT, D., MILLER, J., CHU, C., TAYLOR G.T. Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. **J Clin Pathol** **62**:350–356, 2009.
- ALVAREGA, M., COTTA, A.C., DUFLOTH, R.M., SCHMITT, F.C.L. Contribuição do patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** **2**(39):167-177, 2003.
- AMENDOLA, L.C.B. & VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia** **51**(4): 325-330, 2005.
- AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS (ACMG). Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations. **Genetics in Medicine** **2** (6):356-61, 2000.
- ANDRÉ, S., TOMÁS, A.R., FONSECA, R. Carcinoma de Mama: Determinação da Amplificação do HER2 por Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH). **Acta Med Port** **18**: 417-422, 2005.
- BABICKA, L., RANSDORFOVA, S., BREZINOVA, J., ZEMANOVA, Z., SINDELAROVA, L., SISKOVA, M., MAALOUFOVA, J., CERMAK, J., MICHALOVA, K. Analysis of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolor FISH. **Leukemia Research** **31**: 39-47, 2006.
- BAIN, B. **Diagnóstico em Leucemias**, 2ª ed. Editora Revinter, São Paulo, 2003.
- BRAUN, S.; VOGL, F.D.; NAUME, B.; JANNI, W.; OSBORNE, M.P.; COOMBES, R.C.; SCHLIMOK, G.; DIEL, I.J.; GERBER, B.; GEBAUER, G.; PIERGA, J.Y.; MARTH, C.; ORUZIO, D.; WIEDSWANG, G.; SOLOMAYER, E.F.; KUNDT, G.; STROBL, B.; FEHM, T.; WONG, G.Y.C.; BLISS, J.; VINCENT-SALOMON, A.; PANTEL, K. A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. **The new england journal of medicine** **353**(8): 793-802, 2005.
- CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Alterações cromossômicas em síndrome mielodisplásica. **Rev. bras. hematol. hemoter.** **28**(3):182-187, 2006.
- CHERRY, A.M., BROCKMAN, S.R., PATERNOSTER, S.F., HICKS, G.A., NEUBERG, D., HIGGINS, R.R., BENNETT, J.M., GREENBERG, P.L., MILLER, K., TALLMAN, M.S., ROWE, J. DEWALD, G.W. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. **Leukemia Research** **27**: 1085-1090, 2003.
- CLIMENT, J., DIMITROW, P., FRIDLYAND, F., PALACIOS, J., SIEBERT, R., ALBERTSON, D.G., GRAY, J.W., PINKEL, D., LLUCH, A., MARTINEZ-CLIMENT, J.A. Deletion of Chromosome 11q Predicts Response to Anthracycline-Based Chemotherapy in Early Breast Cancer. **Cancer Res.** **67**(2): 818-826, 2007.

DANTAS, E.L.R., SÁ, F.H.L., CARVALHO, S.M.F., ARRUDA, A.P., RIBEIRO, E.M., RIBEIRO, E.M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia** 55(3): 263-269, 2009.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer, experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 10: 19:403, 1991.

EISENBERG, A. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão da literatura). **Rev Bras Cancerologia** 47(4):377-88, 2001.

ESTIMATIVAS 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde.

FETT-CONTE, A.C., VENDRAME-GOLONI, C.B., HOMSI, C.M., BORIM, L.N.B., ZOLA, P.A., RICCI, O. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto – SP. **Rev.bras.hematol.hemoter.** 22(3): 374-386, 2000.

FISCHER, K., SCHOLL, C., SALAT, J., FROHLING, S., SCHLENK, R., BENTZ, M., STILGENBAUER, S., LICHTER, P., AND DOHNER, H. Design and validation of DNA probe sets for a comprehensive interphase cytogenetic analysis of acute myeloid leukemia **Blood** 88: 3962 – 3971, 1996.

FRIDMAN, C., KOK, F., KOIFFMANN, C.P. Síndrome de Prader-Willi em lactentes hipotônicos. **Jornal de Pediatria** 76(3):246-50, 2000.

GARNIS, C., BUYS, T.P.H, LAM, W.L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol cancer** 3(9): 3-9, 2004.

GEIGL, J.B.; OBENAUF, A.C.; SCHWARZBRAUM, T.; SPEICHER, M.R. Defining ‘chromosomal instability’. **Cell Press** 4(2): 64-69, 2008.

GRUSHKO, T.A., DIGNAM, J.J., DAS, S., BLACKWOOD, A.M., PEROU, C.M., RIDDERSTRÅLE, K.K., ANDERSON, K.N., WEI, M.J., ADAMS, A.J., HAGOS, F.G., SVEEN, L., LYNCH, H.T., WEBER, B.L., OLOPADE, O.I. MYC Is Amplified in BRCA1-Associated Breast Cancers. **Cancer Research** 10: 499-507, 2004.

GUERRA, M. FISH, Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2004.

HACKEL, C., VARELLA-GARCIA, M. Interphase cytogenetics using fluorescence *in situ* hybridization: an overview of its application to diffuse and solid tissue. **Brazilian Journal of Genetics** 20(1): 97-106, 1997.

HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., DIEBOLD, J., FLANDRIN, G., MULLER-HERMELINK, H. K., VARDIMAN, J., LISTER, T. A. & BLOOMFIELD, C. D. The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Annals of Oncology** 10: 1419-1432, 1999.

HOLLAND, A.J., CLEVELAND, D.W. Boveri revisited: chromosomal instability, Aneuploidy and tumorigenesis. **Nature** **10**: 478-488, 2009.

HYUN, C.L.; LEE, H.E.; KIM, K.S.; KIM, S-W; KIM, J.H.; CHOE, G.; PARK, S.Y. The effect of chromosome 17 polysomy on HER2/neu status in breast cancer. **J Clin Pathol** **61**: 317- 321, 2008.

ISMAEL, G.F.V., SEGALLA, J.G.M., ROSA, D.D. O Desenvolvimento de drogas com alvo molecular e seu impacto no tratamento do câncer. **Prática Hospitalar** **54**: 13-18, 2007.

KOPS, G.J.P.L.; WEAVER B.A.A., *et al.* On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nature Reviews Cancer** **5**(10): 773-785, 2005.

LAL, P., SALAZAR, A.P., LADANYI, M., CHEN, B. Impact of Polysomy 17 on HER-2/neu Immunohistochemistry in Breast Carcinomas without HER-2/neu Gene Amplification. **Journal of Molecular Diagnostics** **3**(5):155-195, 2003.

LICHTVAN, L.C.L. Citogenética nas leucemias linfóides agudas. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Federal do Paraná, 2007.

LOURO, I.D.; LLERENA JR., J.C.; VIEIRA DE MELO, M.S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**, 2a ed., São Paulo, MSG Produção Editorial, 2002.

MA, Y., WANG, X., XU,X., LIN, G. Prognostic value of trisomy 8 in primary myelodysplastic syndrome. [Internal Medicine Journal](#) **10**(39), 2009.

MACVILLE, M., VELDMAN, T., PADILLA-NASH, H., WANGSA, D., OBRIEN, P., SCHROCK, E., RIED, T. Spectral Karyotyping, a 24-colours FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. **Histochem Cell Biol.****108**(4-5):299-305, 1997.

MIALHE, A., LOUIS, J., CASSANELLI, S., SEIGNEURIN, D. Chromosome 11 aneuploidy detected by fluorescent in situ hybridization (FISH) in breast cancer: relation with progesterone receptor expression. **Cytopathology** **10**, 79–86, 1999.

NOWELL, P. C. & HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science** **132**: 1488–1501, 1960.

NUSSBAUM, R.L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F.; **THOMPSON & THOMPSON: Genética Médica**, 6a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO Cancer Control Programme**. Disponível em <www.who.int/cancer/en/> Acessado em 18 de maio de 2009.

PAIETTA, E. Comments on the 2001 WHO proposal for the classification of haematopoietic neoplasms. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. 16(4): 547-559, 2003.

PAYNE, S.J.L.; BOWEN, R.L.; JONES, J.L.; WELLS, C.A. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology** **52**: 82-90, 2008.

PERSONS, D.L, ROBINSON, R.A, HSU, P.H, SEELING, S.A, BORELL, T.J, HARTMANN, L.C, et al. Chromosome-specific aneusomy in carcinoma of the breast. **Clin Cancer Res** **2**: 883–8, 1996.

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. Genética do Câncer Humano. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

PUPA, S.M.; TAGLIABUE, E.; MENARD, S.; ANICHINI, A. HER-2: A Biomarker at the Crossroads of Breast Cancer Immunotherapy and Molecular Medicine. **J Cell Physiol** **205**:10-18, 2005.

RAJAPAKSEA, I., PERLMANC, M. D., SCALZOA, D., KOOPERBERGB, C., GROUDINEA, M., KOSAKE, S. T. The emergence of lineage-specific chromosomal topologies from coordinate gene regulation. **PNAS** **106**(16): 6679–6684, 2009.

REINHOLZ, M.M., BRUZEK, A.K. VISSCHER, D.W., LINGLE, W.L., SCHROEDER, M.J., PEREZ, E.A., JENKINS, R.B. Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. **Lancet Oncol** **10**: 267–77, 2009.

REGO, E. M., & PANDOLFI, P. P. Reciprocal products of chromosomal translocations in human cancer pathogenesis: key players or innocent bystanders? **Trends Mol Med** **8**: 396-405, 2002.

RODRIGUEZ-PINILLA, S.M., JONES, R.L., LAMBROS, M.B.K., ARRIOLA, E., SAVAGE, K., JAMES, M., PINDER, S.E., REIS-FILHO, J.S. MYC amplification in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation study. **J Clin Pathol** **60**:1017–1023, 2007.

ROGATTO, S. R. **CITOGENÉTICA SEM RISCO: Biossegurança e Garantia de Qualidade**. Editora FUNPEC, Ribeirão Preto, 2000.

ROGATTO, S.R.; RAINHO, C.A.; Citogenética Molecular e Câncer. FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Organizado por Marcelo Guerra – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

ROSEN, E.M., FAN, S., PESTELL, R.G., GOLDBERG, I.D. BRCA1 Gene in Breast Cancer. **Journal of Cellular Physiology** **196**:19–41, 2003.

RUMMUKAINEN, J., KYTÖLÄ, S., KARHU, R., FARNEBO, F., LARSSON, C., ISOLA, J.J. Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and spectral karyotyping. **Cancer Genet Cytogenet** **126**: 1–7, 2001.

SAGRILLO, R.M., CARDOSO, S. H., SILVA, L.R.J., GRAÇA, C.H.N., FERREIRA, E., HAMERSCHLAK, N., GUERRA, J.C.C., BASCALL, N.S., ANDRADE, J.A.D., BOROVNIK, C.L. (2005). Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** **27**(2): 94-101, 2005.

[SHAFFER](#), L.G. [TOMMERUP](#), N. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger:130p., 2005

SIGURDSSON, S., BÖDVARSDOTTIR, S.K., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., STEINARSDOTTIR, M., JONASSON, J.G., ÖGMUNDSDOTTIR, H.M, EYFJÖRD, J.E. p53 abnormality and chromosomal instability in the same breast tumor cells. **Cancer Genet Cytogenet** **121**: 150–155, 2000.

SILVA, R. L. A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C. G. & ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004, p.29-42.

SIMÕES, B.P. Avaliação de doença residual mínima pós-transplante de medula óssea. **Medicina** **33**(4): 433-442, 2000.

SPONCHIADO, G., ALCOBAS, J.P.C., REQUIÃO, L., MORALES, S. M., ZAOR, C.J., ADAM, M.L. A evolução do diagnóstico citogenético em humanos. **RUBS**, **1**(2): 18-24, 2005.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell, Oxford, 2003.

TORRES, E.M., WILLIAMS, B.R., AMON, A. Aneuploidy: Cells Losing Their Balance. **Genetics** **179**: 737–746, 2008.

TSUKAMOTO, F., MIYOSHI, Y., EGAWA, C., KASUGAI, T., TAKAMI, S., INAZAWA, J., NOGUCHI, S. Clinicopathologic Analysis of Breast Carcinoma with Chromosomal Aneusomy Detected by Fluorescence In Situ Hybridization. **Cancer Cytopathology** **2**(93): 165-170, 2001.

VANCE, G. H., KIM, H., HICKS, G. A., CHERRY, A. M., HIGGINS, R., HULSHIZER, R. L., TALLMAN, M. S., FERNANDEZ, H. F., DEWALD, G. W. Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900). **Leukemia Research** **31**(5): 605-609, 2006.

VARELLA-GARCIA, M. Molecular cytogenetics in solid tumors: Laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. **Oncologist** **8**(1): 45-58, 2003.

VARELLA-GARCIA, M., KITTELSON J., SCHULTE, A. P. KIEU, O.V., WOLF, H. J., ZENG, C., HIRSCH, F. R., BYERS, T., KENNEDY, T., MILLER, Y. E., KEITH, R. L., WILBUR, A. F. Multi-target interphase fluorescence in situ hybridization assay increases sensitivity of sputum cytology as a predictor of lung cancer. **Cancer Detection and Prevention** **28**(4): 244-251, 2004.

VIEIRA, D.S.C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** **30**(1):42-47, 2008.

WATTERS, A.D., GOING, J.J., COOKE, T.G., BARTLET, J.M.S. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment** **77**: 109–114, 2003.

WEAVER, B.A.A., CLEVELAND, D.W. Does aneuploidy cause cancer? **Current Opinion in Cell Biology** **18**: 658–667, 2006.

WEI, M., GRUSHKO, T.A., DIGNAM, J., HAGOS, F., NANDA, R., SVEEN, L., XU, J., FACKENTHAL, J., TRETIAKOVA, M., DAS, S., OLOPADE, O.I. BRCA1 Promoter Methylation in Sporadic Breast Cancer Is Associated with Reduced BRCA1 Copy Number and Chromosome 17 Aneusomy. **Cancer Res**, **65**(23):10692-10699, 2005.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contacto. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc.

Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e de tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer

sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ____/____/____

8.2 ANEXO 2

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

8.3 ANEXO 3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS”

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para detecção de alterações genéticas nas células tumorais. Para isto pedimos sua colaboração. Deixamos claro que sua participação é voluntária, não influenciando no seu tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3331-5154 ou (48) 3331-9804 e conversar com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro ou com a Profa. Dra. Iliada Rainha de Souza.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, além dos exames de rotina, também serão realizados outros exames mais específicos que podem contribuir para o diagnóstico e para a escolha do tratamento a ser realizado. Além da coleta de sangue ou medula óssea, não será necessário nenhum procedimento adicional.

Riscos:

Você não vai correr nenhum risco ao colaborar com este estudo. A coleta de sangue e/ou medula óssea são procedimentos normais para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios:

Este estudo pode contribuir para a eficácia do tratamento a ser realizado, além disso os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para diagnóstico e tratamento do câncer, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ____/____/____

8.4 ANEXO 4

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

***Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa
“AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS”, e
concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.***

Florianópolis,

Assinatura: _____ RG: _____

8.5 ANEXO 5

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG

QUESTIONÁRIO:

Data: __/__/__ **Entrevistador:** _____
Coleta: () sangue () tumor **Médico responsável:** _____

Dados Pessoais:

Nome _____ do
Paciente: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____
Profissão: _____ Escolaridade: _____
Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____
Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____
Naturalidade: _____ Descendência: _____
Raça e cor: () B () N () P

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____
Naturalidade: _____ Descendência: _____ Profissão: _____
Nome da mãe: _____
Naturalidade: _____ Descendência: _____ Profissão: _____
Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos Pessoais:

Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
Come CARNE regularmente? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
Ingre BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não
Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente
Quantidade: _____
Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?
() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____
Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?
() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____
Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não
Tipo: _____

Frequência: _____

FUMA? () Sim () Não

FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência: _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª Gestação _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____ () E _____

Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total: _____

Histórico Médico

Casos de CÂNCER na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo de Câncer: _____

Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não

Local: _____

Grau de Parentesco: _____

Tem ou teve alguma outra doença grave? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Histórico do CAMA:

Observações:
